

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**FIA STANOVENÍ HEPARINU SE
SPEKTROFOTOMETRICKOU DETEKCÍ**

Determination of Heparine by FIA with Spectrophotometric Detection

Bakalářská práce

studijního oboru Klinická a toxikologická analýza

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele RNDr. Karla Nesměráka, Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 1. června 2009

Obsah

	Seznam zkratk a symbolů	4
1	Cíl práce	5
2	Literární úvod	6
2.1	Průtoková injekční analýza	6
2.2	Heparin	9
2.2.1	Metody stanovení heparinu	10
2.3	Fenosafranin	11
3	Experimentální část	12
3.1	Použité chemikálie	12
3.2	Molekulová absorpční spektrofotometrie	12
3.3	Průtoková injekční analýza	12
3.4	Zpracování naměřených dat	13
4	Výsledky a diskuse	14
4.1	Statické měření	14
4.2	Optimalizace FIA stanovení	16
4.3	Kalibrační přímka	18
5	Závěr	20
	Literatura	21

Seznam zkratk a symbolů

A	absorbance	
a	úsek lineární regrese	
c	molární koncentrace	[mol dm ⁻³]
F	průtoková rychlost nosného proudu ve FIA	[ml min ⁻¹]
FIA	flow injection analysis, průtoková injekční analýza	
h	výška FIA peaku	
L	délka reakční cívky ve FIA	[cm]
LOQ	limit stanovení (kvantifikace)	[mol dm ⁻³]
M	molární hmotnost	[g mol ⁻¹]
PSF	fenosafranin	
$s_{y/x}$	směrodatná odchylka lineární regrese	
S	plocha FIA peaku	[s]
t_a	čas potřebný k dopravě předního okraje profilu toku vzorku k detektoru	[s]
T	čas potřebný k dosažení maximálního signálu na detektoru	[s]
V	objem nastříkovaného vzorku ve FIA	[μl]
w	šířka FIA peaku	[s]
λ	vlnová délka	[nm]

1 Cíl práce

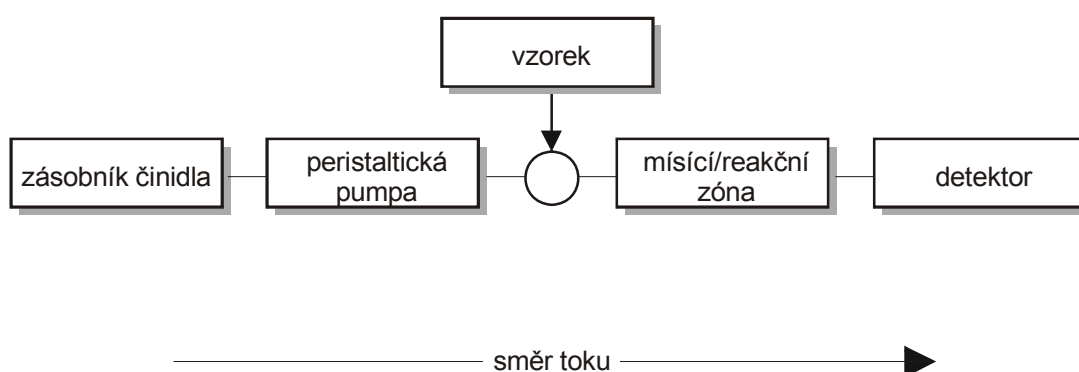
Cílem předkládané bakalářské je navržení a optimalizace metody pro stanovení heparinu pomocí injekční průtokové analýzy se spektrofotometrickou detekcí. Vzhledem k tomu, že heparin neposkytuje při této detekční metodě potřebou odezvu, je k jeho detekci využita tvorba iontových asociátů s barvivem fenosafraninem.

2 Literární úvod

2.1 Průtoková injekční analýza

Průtoková injekční analýza (FIA, z anglického názvu flow injection analysis) byla vyvinuta v polovině sedmdesátých let dvacátého století jako velmi efektivní technika pro automatizované analýzy vzorků. Ve srovnání s jinými instrumentálními analytickými metodami umožňuje FIA rychlou sekvenční analýzu neomezeného počtu vzorků a tím i automatizaci stanovení. K jejím přednostem dále patří úspora objemu vzorků, reagentů i rozpouštědel; a tedy nízké pořizovací a provozní náklady. Teoretické principy FIA jsou shrnuty v monografiích [1–3].

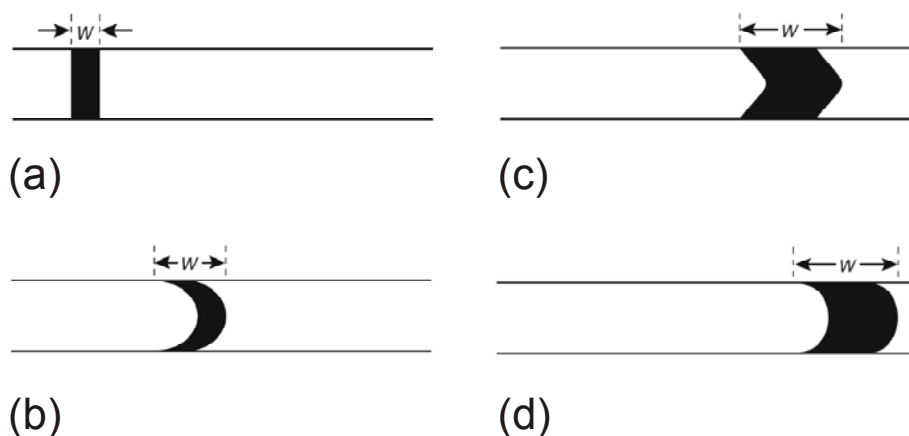
FIA patří do skupiny průtokových metod, v nichž jsou vzorky postupně vpravovány (vstřikovány) v pravidelných intervalech do proudu činidla, který přepravuje vzorky k samotnému detektoru. Na detektoru dochází ke vzniku přechodových signálů, jejichž tvar a velikost závisí na fyzikálních a chemických procesech, které probíhají mezi dobou vstřiku vzorku a dobou detekce. Základní schéma FIA metody pro jeden kanál s jedním činidlem je na obr. 2.1.



Obr. 2.1 Základní schéma injekční průtokové analýzy

Roztok činidla, sloužící jako mobilní fáze (nosný proud), je uložen v zásobníku, odkud je čerpadlem (peristaltickou pumpou) vháněn konstantním průtokem do trubic samotného zařízení. Vzorek se vstříkuje přímo do tekoucí proudu činidla. S tímto proudem se dostává přes reakční zónu k vlastnímu detektoru.

Když je vzorek nastříknut do proudu činidla, má obdélníkový profil toku (s šířkou w), jak je uvedeno na obr. 2.2a. Při průchodu mísicí/reakční zónou dochází k disperzi vzorku a zvětšení jeho profilu toku. Existují dva možné způsoby disperze: konvekce vzorku způsobená tokem činidla a difúze v důsledku koncentračního gradientu mezi vzorkem a činidlem. Ke konvekci vzorku dochází laminárním prouděním, ve kterém je lineární rychlost vzorku na stěnách trubičky nulová, zatímco vzorek ve středu trubičky se pohybuje s lineární rychlostí dvakrát větší než je rychlost činidla. Výsledkem je parabolický profil toku, jak je znázorněno na obr. 2.2b. Konvekce je primárním zdrojem disperze vzorku v prvních 100 ms po nastříknutí vzorku do činidla. Druhým příspěvkem k disperzi vzorku je jeho difúze v důsledku koncentračního gradientu mezi vzorkem a činidlem. Difúze probíhá jak v ose proudění činidla (axiálně), tak i kolmo k ní (radiálně), přičemž radiální difúze snižuje lineární rychlost vzorku ve středu trubice a zvyšuje lineární rychlost na okrajích trubice. Difúze pomáhá udržet celistvost profilu toku vzorku (obr. 2.2c), a tím brání úplnému rozptýlení vzorku v proudu činidla. Oba způsoby disperze (konvekce i difúze) mají význam asi 3–20 s po nástřiku vzorku do proudu činidla. Tento čas je tedy normálním časovým měřítkem pro průtokovou injekční analýzu. Po přibližně 25 s je difúze jediným významným příspěvkatelem k disperzi vzorku v čínidle a výsledkem je profil toku podobný tomu, jenž je vyobrazen na obr. 2.2d.

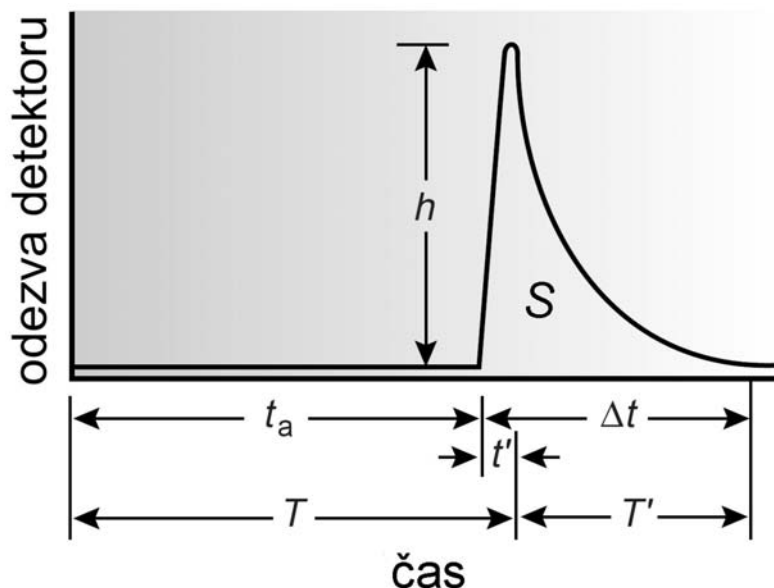


Obr. 2.2 Vliv disperze na průtokový profil vzorku během FIA (upraveno podle [3]):

- (a) při nástřiku vzorku do nosného proudu, (b) disperze způsobená konvekcí,
- (c) disperze vlivem konvekce i difúze, a (d) disperze způsobená pouze difúzí.

V aparatuře mohou být zařazena i další zařízení (např. separační membrány, zařízení pro extrakci kapalina-kapalina, aj.). K detekci analytu v nosném toku se využívá spektrometrických nebo elektrochemických technik. Nejčastěji je to UV/Vis spektrometrie, iontově-selektivní elektrody nebo atomový absorpční spektrometr.

Zobrazením časové závislosti velikosti detekovaného signálu je FIA křivka, tzv. „fiagram“, kterou lze charakterizovat pomocí šesti parametrů (obr. 2.3). První dva parametry určují čas potřebný k dopravě vzorku od místa nástřiku až do detektoru. Čas t_a určuje okamžik, kdy k detektoru dorazí přední okraj profilu toku vzorku. Druhý sledovaný čas T určuje dobu potřebnou k dosažení maximálního signálu na detektoru (tj. vrcholu FIA peaku). Rozdíl mezi těmito časy je označován jako t' . Hodnota t' je nulová, pokud je hlavním prostředkem k disperzi vzorku konvekce; hodnota t' se zvyšuje tím více, čím je vyšší vliv šíření v důsledku koncentračního gradientu na rozptýlení vzorku v činidle. Další dva parametry popisují čas potřebný od příchodu vzorku k detektoru po ustálení signálu na výchozí hodnotě. Čas Δt je čas, který uběhne od okamžiku, kdy dorazí k detektoru přední okraj profilu toku vzorku, po ukončení průchodu profilu toku vzorku detektorem. Čas, který uběhne od dosažení píku po okamžik jeho ustálení na výchozí hodnotě se označuje jako čas návratu T' . Parametrem kvantifikujícím obsah stanovované složky ve vzorku

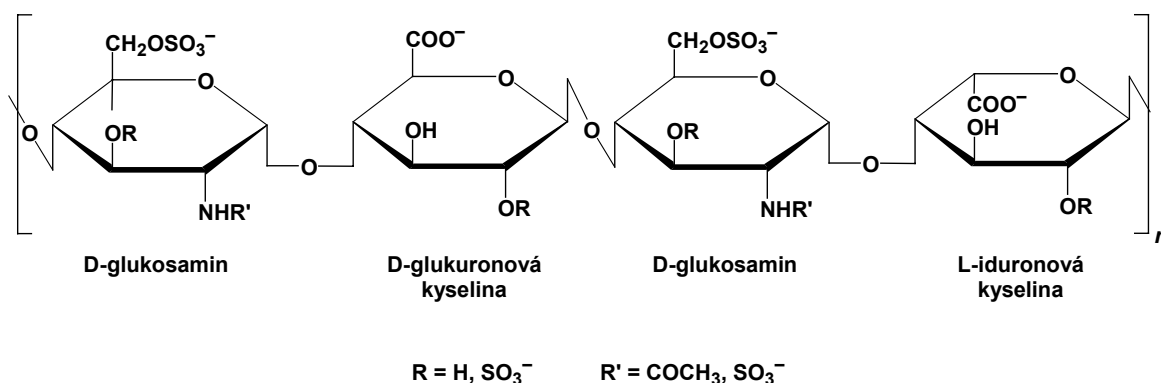


Obr. 2.3 Záznam FIA analýzy (FIA křivka, „fiagram“) s charakteristickými parametry (vysvětleno v textu). Upraveno podle [3].

je výška peaku h , jež se rovná rozdílu mezi maximálním signálem a velikostí výchozí hodnoty signálu; popřípadě jím může být i plocha peaku S získaná integrací. Z výšky (plochy) FIA peaku lze určit i citlivost metody měření. Z času návratu lze pak určit frekvenci, s jakou lze vzorky dávkovat.

2.2 Heparin

Heparin je fyziologicky významná látka patřící do skupiny glykosaminglykanů [4]. Z hlediska struktury (obr. 2.4) je to směs heteropolysacharidů o molekulové hmotnosti 5 000 až 30 000 g mol⁻¹, v jejichž lineárním řetězci se střídá hexuronová (L-iduronová, resp. D-glukuronová) kyselina připojená α (1–4) vazbou k D-glukosaminu. Proměnlivý počet sulfátových, karboxylových a acetylových zbytků na řetězci vede k tomu, že každá disacharidová jednotka heparinu nese 3–4 negativní náboje.



Obr. 2.4 Struktura heparinu

Heparin je látka tělu vlastní, která se spolu s histaminem ve vysoké koncentraci vyskytuje v tkáňových žírných buňkách. Obzvláště velká množství heparinu jsou v játrech, v plicích a ve střevní sliznici. Fyziologický význam heparinu není dosud zcela objasněn, ale vzhledem k tomu, že se ukládá i vyplavuje spolu s histaminem předpokládá se, že jeho funkcí je zabránit sražení krve při zpomalení krevního proudu při histaminové vasodilataci.

Z farmakologického hlediska patří heparin mezi antikoagulanty, tedy látky působící proti srážení krve [5–7]. Po poranění cévy dochází k aktivaci srážecích faktorů a následný vznik krevní sraženiny vede k ucpání defektu cévní stěny a zastavení krvácení. Na druhou

stranu může vznik krevních sraženin uvnitř cévy vést k životu nebezpečné trombóze. Antikoagulační působení heparinu je založeno na jeho vazbu na antithrombin III (též serpin), specifický inhibitor thrombinu. Heparin vazbou na antithrombin III způsobí jeho konformační změnu vedoucí k zvýšení rychlosti interakce antithrombinu III s koagulačními faktory až tisíckrát. Heparin rovněž katalyzuje inhibici thrombinu pomocí heparin kofaktoru II. Heparin zároveň inhibuje vznik volného trombinu.

Terapeuticky používaný heparin se získává ze sliznice vepřových střev a z hovězích plic. V současnosti jsou používány dva druhy heparinu: standardní (nefrakcionovaný) heparin a nízkomolekulární heparin. Nízkomolekulární heparin se získává štěpením standardního heparinu na fragmenty molekulové hmotnosti 2 000 až 9 000 g mol⁻¹. V porovnání se standardním heparinem má nízkomolekulární heparin zhruba dva až čtyřikrát vyšší antikoagulační aktivitu. Antikoagulační účinek tedy závisí na délce řetězce heparinu. Proto se obvykle při dávkování heparinu místo miligramů používá biologická aktivita heparinu vyjádřená pomocí mezinárodních jednotek (IU), tedy jako aktivita deklarovaného objemu mezinárodního standardu. Heparin musí být podáván parenterálně, protože se neabsorbuje při perorálním podání. Nitrožilní podání vede k téměř okamžitému nástupu antikoagulačního účinku; vrcholu hladiny heparinu je dosaženo během dvaceti až třiceti minut. Po subkutánním podání je dosaženo vrcholu hladiny heparinu po dvou až čtyřech hodinách, nástup antikoagulačního účinku nastává po jedné až dvou hodinách. Intramuskulárně se heparin nepodává kvůli nepředvídatelné absorpční rychlosti, lokálnímu krvácení a dráždění. Heparin se neváže na plazmatické proteiny a neprostupuje placentou. Heparin je biotransformován v játrech a exkrován ledvinami. Indikace terapeutického užití heparinu jsou: profylaxe a terapie trombóz, konsumpční koagulopatie, embolie.

2.2.1 Metody stanovení heparinu

Stanovení heparinu v lékových formách je nejčastěji založeno na biochemických metodách, např. lékopisné stanovení [8] založené na *in vitro* porovnávání schopnosti snižovat rychlost srážení ovčí plasmy stanovovaného heparinu se standardem. Kromě biologických metod byla popsána stanovení chromatografická a elektroforetická [9, 10], případně i iontově-selektivní elektrodou [11].

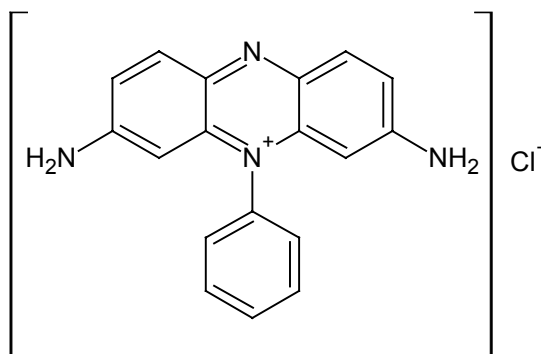
V porovnání s ostatními navrženými metodami je spektrometrické stanovení heparinu jednodušší, levnější a citlivější. V literatuře navržená spektrometrická stanovení [12–15] jsou založena na interakci negativně nabitého heparinu s kationovými barvivy, vedoucí ke

vzniku agregátů projevujících se změnou absorbance barviva. Kromě statického uspořádání bylo navrženo i FIA stanovení [16].

V nedávné době bylo navrženo stanovení založené na interakci heparinu s kationtovým barvivem fenosafraninem [17]. Interakce heparinu s fenosafraninem vedla k hypochromnímu posunu absorpčního maxima fenosafraninu z 518 nm na 466 nm. Vzájemný poměr heparin:fenosafranin byl stanoven na 5–6:1. Toto stanovení se stalo podkladem pro vypracování FIA stanovení v této práci.

2.3 Fenosafranin

Fenosafranin (PSF), systematicky 3,7-diamino-5-fenylfenazinium chlorid (obr. 2.5), CAS [81-93-6], patří do skupiny kationtových barviv. Tvorby jeho iontových asociátů s řadou sloučenin se využívá v nejrůznějších spektrometrických stanoveních v UV/Vis spektrometrii, luminiscenční i fluorescenční spektrometrii.



Obr. 2.5 Struktura fenosafraninu

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

Studovanou látkou byla sodná sůl heparinu, CAS 9041-084, $M = 667,4 \text{ g mol}^{-1}$. Jako zdroj heparinu byl použit injekční roztok Heparin Forte Léčiva (Zentiva, ČR) s aktivitou heparinu 25 000 IU v 1 ml (tomu odpovídá koncentrace heparinu 167 mg ml^{-1} , při deklarované aktivitě 150 IU mg^{-1}). Vhodným naředěním alikvotu injekčního roztoku vodou byl připraven zásobní roztok heparinu o koncentraci $5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$.

Byl použit fenosafranin, CAS 81-93-6, $M = 322,79 \text{ g mol}^{-1}$, čistoty 80 % (Sigma Aldrich). Zásobní roztok o koncentraci $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ byl připraven rozpuštěním odváženého množství látky v deionizované vodě.

K přípravě roztoků byla používána deionizovaná voda připravená na zařízení MiliQ (Milipore) s hodnotou pH = 6,0 (upraveno pomocí roztoku hydroxidu sodného).

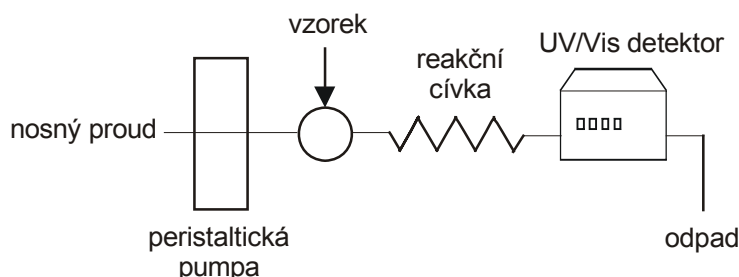
3.2 Molekulová absorpční spektrofotometrie

Molekulová absorpční spektra studovaných roztoků byla měřena ve viditelné oblasti na spektrofotometru HP 8453 (Hewlett Packard) s diodovým polem a zpracována softwarem UV-Visible Chemstation, ver. A.09 (Hewlett Packard). Roztoky byly měřeny v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 cm při laboratorní teplotě.

3.3 Průtoková injekční analýza

Průtoková injekční analýza byla měřena na aparatuře znázorněné na obr. 3.1. Nosným proudem byl vodný roztok fenosafraninu o koncentraci $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Byla použita peristaltická pumpa Masterflex L/S (Cole-Palmer) s hadičkami Tygon R-3603 (Cole-Palmer). Z výše uvedených hadiček Tygon byly připraveny i reakční cívky délky 30 a 100 cm. K nástřiku vzorků byl použit teflonový středotlaký šesticestný ventil V-450 (Upchurch Scientific) s dávkovacími cívkami délky 30 a 100 μl . K detekci byl použit výše uvedený spektrofotometr v kinetickém módu s průtokovou kyvetou o objemu 130 μl ;

vlnová délka detekce byla nastavena na 518 nm. Jako analytický signál sloužila plocha FIA peaku, vyhodnocovaná v programu Origin 7.0 (Microcal).



Obr. 3.1 Schéma FIA aparatury pro stanovení heparinu se spektrofotometrickou detekcí

3.4 Zpracování naměřených dat

Naměřená data byla zpracována běžnými statistickými postupy [18]. Prezентované výsledky měření jsou mediány z nejméně tří měření (testovaných na odlehlost).

Lineární závislosti dvou proměnných byly zpracovány metodou lineární regrese s vyhodnocením příslušných odchylek a korelačních koeficientů. Statistický detekční limit (LOQ) byl vypočítán podle vztahu:

$$LOQ = \frac{10 \cdot s_{x/y}}{a} \quad (3.1)$$

kde $s_{y/x}$ je směrodatná odchylka lineární regrese a a je směrnice lineární regrese.

Maximální vzorkovací frekvence byla vypočítána ze vztahu

$$S_{\max.} = \frac{3600}{\Delta t} \quad (3.2)$$

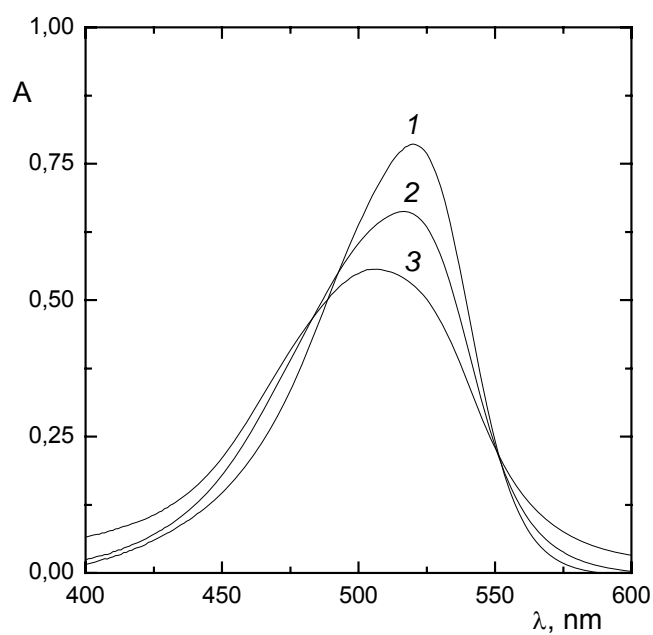
kde $S_{\max.}$ [h^{-1}] je maximální počet vzorků analyzovatelných za hodinu, Δt je šířka FIA peaku při základně [s] pro nejvyšší koncentraci kalibrační přímky.

Výpočty byly realizovány pomocí softwarových programů Microsoft Excel 2000 (Microsoft) a Origin 7.0 (Microcal).

4 Výsledky a diskuse

4.1 Statické měření

Vodný roztok fenosafraninu o koncentraci $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ vykazuje absorpční maximum při 518 nm. Vlivem stoupající koncentrace heparinu (v rozsahu $0,0\text{--}5,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) dochází k poklesu intenzity absorpčního maxima fenosafraninu na hodnotu 506 nm (obr. 4.1).

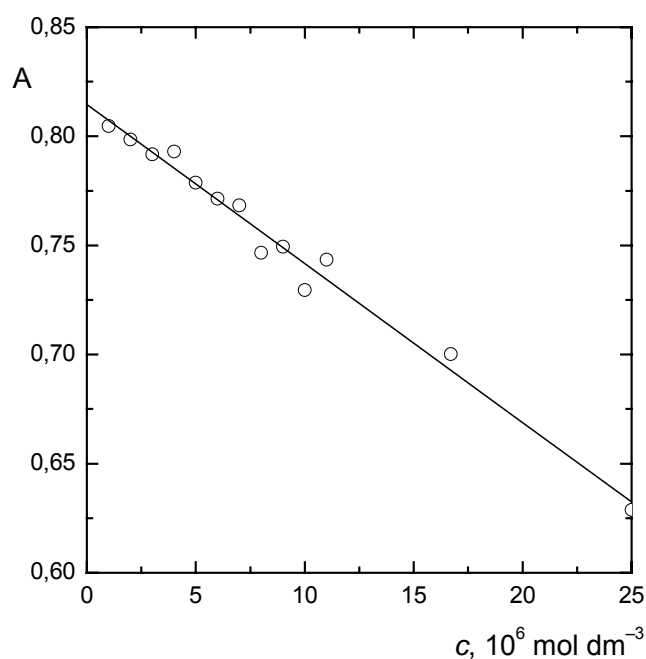


Obr. 4.1 Absorpční spektra fenosafraninu ($c = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) v přítomnosti zvyšující se koncentrace heparinu: (1) 0 mol dm^{-3} , (2) $1,1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ a (3) $5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.

Poklesu absorbance roztoku fenosafraninu při vlnové délce 518 nm bylo využito pro naměření kalibrační přímky pro spektrofotometrické stanovení heparinu (obr. 4.2). Kalibrační přímku, která byla lineární v koncentračním rozsahu $0,0\text{--}2,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ heparinu, lze popsat rovnicí

$$A = -7286,44 c (\text{mol dm}^{-3}) + 0,81 \quad (4.1)$$

$$r = -0,9914$$



Obr. 4.2 Závislost absorbance absorpčního maxima při 518 nm fenosafraninu o koncentraci $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ na koncentraci přidaného heparinu

4.2 Optimalizace FIA stanovení

Pro průtokové stanovení heparinu byla navržena jednoduchá aparatura zobrazená na obr. 3.1, v níž byly do nosného proudu, jímž byl vodný roztok fenosafraninu o koncentraci $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ dávkovány vzorky heparinu.

Prvním krokem byla optimalizace jednotlivých parametrů majících vliv na velikost odezvy detektoru pomocí dvojúrovňového faktorového pokusu [18]. Jako kritické parametry byly vybrány: průtoková rychlost nosného proudu, objem dávkovaného vzorku a délka reakční cívky. Hodnoty faktorů jsou uvedeny v tabulce 4.1. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 4.2.

Tab. 4.1 Studované parametry při optimalizaci FIA stanovení heparinu a jejich použité úrovně

faktor	parametr	hladina	úroveň
A	průtoková rychlost	–	3 ml min ⁻¹
		+	6 ml min ⁻¹
B	dávkovaný objem vzorku	–	30 µl
		+	100 µl
C	délka reakční cívky	–	20 cm
		+	100 cm

Tab. 4.2 Plochy FIA peaků v závislosti na úrovních studovaných faktorů
($c(\text{fenosafranin}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $c(\text{heparin}) = 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$)

úroveň faktoru			S
A	B	C	s
-	-	-	0,741
+	-	-	0,361
-	+	-	1,877
-	-	+	0,699
+	+	-	1,018
+	-	+	0,359
-	+	+	1,896
+	+	+	1,001

Tab. 4.3 Významnosti vlivu sledovaných faktorů a jejich kombinací při FIA analýze heparinu
 $(c(\text{fenosafranin}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}, c(\text{heparin}) = 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3})$

faktor / kombinace faktorů	A	B	C	AB	AC	BC
w_i	-0,619	0,908	-0,010	-0,259	0,001	0,011

Významnost úrovní sledovaných parametrů i jejich vzájemných kombinací byla stanovena výpočtem váhy faktoru w_i (tab. 4.3). Z výsledků faktorového pokusu plyne, že nejvýznamnějším faktorem je faktor B – dávkovaný objem vzorku, pro který je optimální úroveň (+), tedy 100 μl . Významný je i faktor A – průtoková rychlost nosného proudu, jejíž úroveň (–), tedy 3 ml min^{-1} , vede ke zvětšení plochy FIA peaku. Ostatní faktory včetně jejich kombinací jsou zanedbatelné.

Jako optimální byly tedy zvoleny následující parametry FIA analýzy:

- průtoková rychlost nosného proudu 3 ml min^{-1} ;
- dávkovaný objem vzorku 100 μl ;
- délka reakční cívky 20 cm.

4.3 Kalibrační přímka

Při nastavených optimálních parametrech FIA stanovení byla proměřena kalibrační přímka (obr. 4.3) v lineárním dynamickém rozsahu $0,0\text{--}1,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (resp. $0\text{--}3000 \text{ IU ml}^{-1}$) heparinu. Kalibrační přímka je charakterizována rovnicí

$$S(\text{s}) = 45003 c (\text{mol dm}^{-3}) + 1,4 \quad (4.2)$$

$$r = 0,9905$$

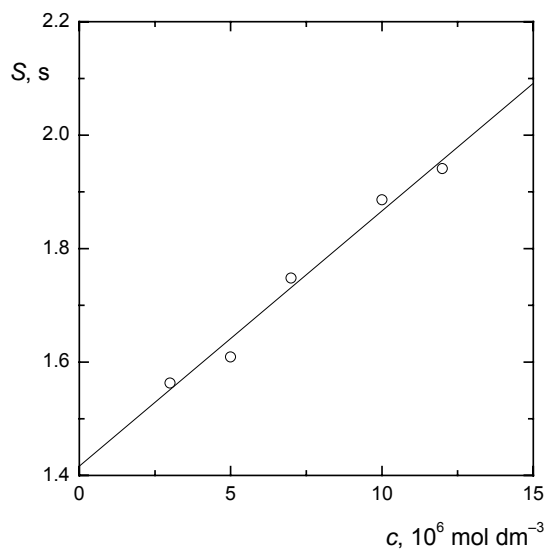
$$LOQ = 5,9 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$$

resp.

$$S(\text{s}) = 2,2 \times 10^{-4} c (\text{IU ml}^{-1}) + 1,4 \quad (4.3)$$

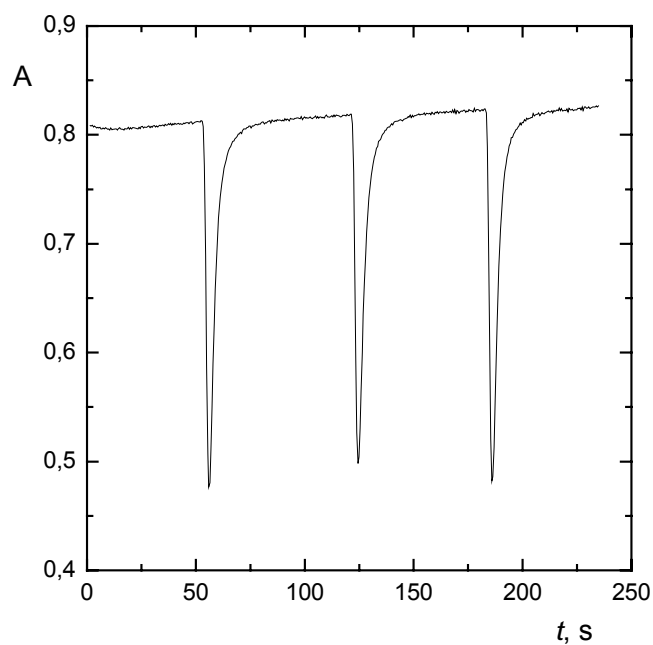
$$r = 0,9974$$

$$LOQ = 640 \text{ IU ml}^{-1}$$



Obr. 4.3 Kalibrační přímka pro stanovení heparinu metodou FIA se spektrometrickou detekcí
($c(\text{fenosafranin}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $F = 3 \text{ ml min}^{-1}$, $V = 100 \text{ }\mu\text{l}$, $L = 20 \text{ cm}$, $\lambda = 518 \text{ nm}$)

Pro stanovení hodnoty maximální vzorkovací frekvence byl použit FIA peak odpovídající nejvyšší koncentraci kalibrační přímky (obr. 4.4). Průměrná šířka peaku při základně byla 39 sekund, čemuž odpovídá podle vzorce (3.2) maximální vzorkovací frekvence 92 vzorků za hodinu.



Obr. 4.4 FIA záznam nástřiku tří vzorků heparinu o koncentraci $1,2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ při jeho stanovení metodou FIA ($c(\text{fenosafranin}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $F = 3 \text{ ml min}^{-1}$, $V = 100 \text{ }\mu\text{l}$, $L = 20 \text{ cm}$, $\lambda = 518 \text{ nm}$)

5 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo navržení a optimalizace metody pro stanovení heparinu pomocí injekční průtokové analýzy se spektrofotometrickou detekcí.

K vypracování metody bylo použito vzniku iontového asociátu mezi negativně nabitým řetězcem heparinu a kationtovým barvivem fenosafraninem, který se projevuje snížením absorbance absorpčního maxima fenosafraninu při 518 nm. V první části práce byla ve statickém měření ověřena vlnová délka vhodná pro stanovení a naměřena kalibrační závislost pro stanovení heparinu.

V druhé části práce byla navržena jednoduchá aparatura pro FIA stanovení heparinu jeho nástřikem do nosného proudu – roztoku fenosafraninu. Pomocí faktorového pokusu byly stanoveny optimální podmínky stanovení: průtoková rychlost nosného proudu 3 ml min^{-1} , dávkovaný objem vzorku $100 \text{ }\mu\text{l}$ a délka reakční cívky 20 cm. Za optimálních podmínek byla naměřena kalibrační přímka pro stanovení heparinu v lineárním dynamickém rozsahu $0,0\text{--}1,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (resp. $0\text{--}3000 \text{ IU ml}^{-1}$). Byla stanovena maximální vzorkovací frekvence na 92 vzorků za hodinu.

Literatura

- [1] Němcová I., Čermáková L., Rychlovský P.: *Spektrometrické analytické metody I*. Praha, Karolinum 2004, str. 104–105.
- [2] Valcárcel M., Luque de Castro M. D.: *Flow injection analysis*. Chichester, Ellis Horwood 1987.
- [3] Harvey D.: *Modern Analytical Chemistry*. New York, McGraw-Hill 2000, p. 649–658.
- [4] Dagmar L., Hassan F. et al.: *Základní a aplikovaná farmakologie*. Praha, Karolinum a Galén 2002, str. 247–248.
- [5] Lüllmann H., Mohr K., Ziegler A., Bieger D.: *Color Atlas of Pharmacology*. 2nd ed. Stuttgart, Thieme 2000, p. 144.
- [6] *Basic & Clinical Pharmacology*. Edited by Bertram G. Katzung. 8th ed. New York, Lange Medical Book – McGraw-Hill 2001, p. 548–551.
- [7] Mycek M. J., Harvey R. A., Champe P. C.: *Pharmacology*. 2nd ed. Philadelphia, Lippincott-Raven 1997, p. 198–199.
- [8] *Český lékopis 2005*. Praha, Grada 2005, str. 3554–3556.
- [9] Oreste P., Peruzzi M., Stella P.: Micromethod for the determination of heparin in plasma after intravenous and subcutaneous administration. *Analytical Biochemistry* **210** (1993), 136–139.
- [10] Malsch R., Harenberg J., Piazzolo C., Huhle G., Heene D. L.: Chromatographic and electrophoretic applications for the analysis of heparin and dermatan sulfate. *Journal of Chromatography B* **685** (1996) 223–231.
- [11] Ma S.-H., Yang V. C., Meyerhoff M. E.: Heparin-responsive electrochemical sensor. A preliminary study. *Analytical Chemistry* **64** (1992), 694–697.
- [12] Johnson E. A., Mulloy B.: Simple metachromatic assay methods for heparin and protamine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **28** (1976), 836–837.
- [13] Guven K. C.: Metachromatic assay-method for heparin. *Die Pharmazie* **34** (1979), 752–753.

-
- [14] Band P., Lukton A.: The specific assay of heparin by its chemical-properties. *Analytical Biochemistry* **120** (1982), 19–24.
- [15] Powell R. K., Hendley J. O., Pohl K. E., Friedberg A., Valk W. A.: Quantitation of acidic capsular polysaccharides by alcian blue binding. *Analytical Biochemistry* **119** (1982), 31–37.
- [16] Němcová I., Rychlovský P., Havelcová M., Brabcová M.: Determination of heparin using flow injection analysis with spectrophotometric detection. *Analytica Chimica Acta* **401** (1999), 223–228.
- [17] Zhang S., Zhao F., Li N., Li K., Tong S.: Spectroscopic studies on the spontaneous assembly of phenosafranin on glycosaminoglycans templates. *Spectrochimica Acta A* **58** (2002), 2613–2619.
- [18] Miller J. C., Miller J. N.: *Statistics for Analytical Chemistry*. 2nd edition. New York, Ellis Horwood 1992